

• 1/5/2

DIALOG(R)File 352:DERWENT WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rights reserved.

010139956 **Image available**

WPI Acc No: 95-041207/199506

Related WPI Acc No: 99-424909

XRAM Acc No: C95-018545

Thrombomodulin compns. for preventing denaturation prevention of
thrombomodulin - consists of aminoacid(s) and sugar(s), useful for
treating thrombosis, myocardial infarction etc.

Patent Assignee: ASAHI KASEI KOGYO KK (ASAHI)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

| Patent No | Kind | Date | Applicat No | Kind | Date | Main IPC | Week |
|------------|------|----------|-------------|------|----------|--------------|----------|
| JP 6321805 | A | 19941122 | JP 9443837 | A | 19940315 | A61K-037/465 | 199506 B |
| JP 3007785 | B2 | 20000207 | JP 9443837 | A | 19940315 | A61K-038/00 | 200012 |

Priority Applications (No Type Date): JP 9355642 A 19930316

Patent Details:

| Patent | Kind | Lan | Pg | Filing Notes | Application | Patent |
|------------|------|-----|----|----------------|-------------|------------|
| JP 6321805 | A | | 6 | | | |
| JP 3007785 | B2 | | 5 | Previous Publ. | | JP 6321805 |

Abstract (Basic): JP 6321805 A

Thrombomodulin compns. comprise thrombomodulin, one or more
aminoacids or their salts, and one or more sugars.

Further claimed is a method for preventing denaturation of
thrombomodulin by lyophilising characterised by addn. of one or more
of aminoacids and one or more of sugars. Pref. the aminoacids or their
salts are one or more selected from arginine, glutamic acid, proline,
serine, glycine, histidine, asparagine, lysine, phenylalanine, valine,
and their salts. The sugars are monosaccharides or disaccharides,
selected from mannitol, trehalose, lactose, or sucrose. The addn. amt.
of aminoacids or their salts and sugar is 0.01-1 mmole to 1 mg of
thrombomodulin. Compns. are lyophilised ones.

USE/ADVANTAGE - Compns. exhibit anti-blood aggregation, platelet
aggregation inhibitory, and thrombolytic activities and are useful in
treatment and prevention of myocardial infarction, thrombosis,
embolism, peripheral obstruction, obstructive arteriosclerosis,
disseminated intravascular coagulation, angina pectoris, transient
cerebral ischaemia, and toxemia of pregnancy. Compns. are stable and
can prevent denaturation of thrombomodulin.

In an example, human soluble thrombomodulin (1 mg) cultured in
Chinese hamster ovary cells) was dissolved in 2 ml distilled water for
injection. To this soln. was added 0.05 mmol sodium glutamate. Each 2
ml of the soln. was placed in a glass vial and lyophilised at 0.1 mmHg
for 40 hrs. and then at 0.05-0.01 mmHg for 6 hrs. to prepare a compsn.

Dwg.0/0

Title Terms: THROMBOMODULIN; COMPOSITION; PREVENT; DENATURE; PREVENT;
THROMBOMODULIN; CONSIST; AMINOACID; SUGAR; USEFUL; TREAT; THROMBOSIS;
MYOCARDIUM; INFARCTION

Derwent Class: B04; B05

International Patent Class (Main): A61K-037/465; A61K-038/00

International Patent Class (Additional): A61K-047/16; A61K-047/36;

A61P-007/00; C07K-001/00; C07K-003/00; C07K-014/47; C07K-015/14

File Segment: CPI

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-321805

(43) 公開日 平成6年(1994)11月22日

| (51) Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|-------|---------|-----|--------|
| A 6 1 K 37/465 | A C A | 8314-4C | | |
| 47/36 | J | 7433-4C | | |
| C 0 7 K 3/00 | | 8318-4H | | |
| 15/14 | | 8318-4H | | |

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 6 頁)

| | | | |
|--------------|-----------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願平6-43837 | (71) 出願人 | 000000033 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 |
| (22) 出願日 | 平成6年(1994)3月15日 | (72) 発明者 | 油井 雅樹 宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成工業株式会社内 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願平5-55642 | (72) 発明者 | 鶴ヶ谷 守行 宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成工業株式会社内 |
| (32) 優先日 | 平5(1993)3月16日 | | |
| (33) 優先権主張国 | 日本 (J P) | | |

(54) 【発明の名称】 トロンボモジュリン組成物およびその変性防止方法

(57) 【要約】

【構成】 トロンボモジュリン、およびアミノ酸またはその塩類および糖類よりなる群から選ばれた一種または二種以上を含有してなるトロンボモジュリン組成物、および該組成物の凍結乾燥工程でのトロンボモジュリンの変性防止方法。

【効果】 トロンボモジュリンは抗血液凝固剤あるいは血栓溶解剤として期待されるが、トロンボモジュリン溶液を凍結乾燥すると一部が変性する。トロンボモジュリン1mgあたり上記添加物0.01~1mmolを添加することにより凍結乾燥工程でのトロンボモジュリンの変性が防止される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 トロンボモジュリン、およびアミノ酸またはその塩類および糖類よりなる群から選ばれた一種または二種以上を含有してなるトロンボモジュリン組成物。

【請求項2】 アミノ酸またはその塩類が、アルギニン、グルタミン酸、プロリン、セリン、グリシン、ヒスチジン、アスパラギン、リジン、フェニルアラニンおよびバリンまたはその塩類よりなる群から選ばれたの一種または二種以上である請求項1記載のトロンボモジュリン組成物。

【請求項3】 糖類が、単糖類または二糖類である請求項1記載のトロンボモジュリン組成物。

【請求項4】 単糖類または二糖類が、マンニトール、トレハロース、ラクトースまたはスクロースである請求項1記載のトロンボモジュリン組成物。

【請求項5】 アミノ酸またはその塩類および糖類よりなる群から選ばれた一種または二種以上が、トロンボモジュリン1mgあたり0.01~1mmolの添加量である請求項1記載のトロンボモジュリン組成物。

【請求項6】 組成物が、凍結乾燥組成物である請求項1記載のトロンボモジュリン組成物。

【請求項7】 トロンボモジュリンに、アミノ酸またはその塩類および糖類よりなる群から選ばれた一種または二種以上を添加することを特徴とする凍結乾燥工程でのトロンボモジュリンの変性防止方法。

【請求項8】 アミノ酸またはその塩類が、アルギニン、グルタミン酸、プロリン、セリン、グリシン、ヒスチジン、アスパラギン、リジン、フェニルアラニンおよびバリンまたはその塩類よりなる群から選ばれたの一種または二種以上である請求項7記載のトロンボモジュリンの変性防止方法。

【請求項9】 糖類が、単糖類または二糖類である請求項7記載のトロンボモジュリンの変性防止方法。

【請求項10】 単糖類または二糖類が、マンニトール、トレハロース、ラクトースまたはスクロースである請求項9記載のトロンボモジュリンの変性防止方法。

【請求項11】 アミノ酸またはその塩類および糖類よりなる群から選ばれた一種または二種以上が、トロンボモジュリン1mgあたり0.01~1mmolの添加量である請求項7記載のトロンボモジュリンの変性防止方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、トロンボモジュリン、およびアミノ酸またはその塩類および糖類よりなる群から選ばれた一種または二種以上を含有してなるトロンボモジュリン組成物および該組成物の凍結乾燥工程でのトロンボモジュリンの変性防止方法に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、血栓溶解剤として用いられているものには、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼや組織プラスミノゲンアクチベーターがある。また、抗血液凝固剤としてはヘパリンやワーファリンが用いられている。さらに、血小板凝集抑制剤としてはアスピリン、スルフィンピラゾン、ジピリダモール等が使われている。

【0003】これらの血栓溶解剤、抗血液凝固剤および血小板凝集抑制剤は、それぞれ別個に、あるいは併用して、たとえば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症等の疾患の治療および予防に用いられている。しかしながら、これらの血栓溶解剤、抗血液凝固剤および血小板凝集抑制剤は非常に複雑な機構から成り立つ血液の凝固線溶系のごく一部に作用するにすぎない。そこで血液の凝固線溶系に広く作用し、優れた血液凝固抑制作用を示す薬剤が求められていた。

【0004】ところで、トロンボモジュリン(以下TMとする)はトロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用を有する。プロテインCは血液凝固線溶系において重要な役割を演じているビタミンK依存性の蛋白質であり、トロンビンの作用により活性化される。活性型プロテインCは、生体内で血液凝固系因子の活性型第V因子、および活性型第VII因子を失活させ、また血栓溶解作用を有するプラスミノゲンアクチベーターの産生に関与していることが知られている〔鈴木宏治、医学のあゆみ、第125巻、901頁(1983年)〕。

【0005】TMは、このトロンビンによるプロテインCの活性化を促進して抗血液凝固作用と血栓溶解作用を示す活性型プロテインCを大量に産生せしめるものである。従ってTMは生体における抗血液凝固および血栓溶解に大きく寄与するものである。前記のように、TMは抗血液凝固作用と血小板凝集抑制作用および血栓溶解作用を有するのでたとえば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症の疾患の治療および予防に用いられることが期待される。

【0006】TMは細胞からの産生量が少ないので、工業的規模での生産は行われていなかった。しかし、遺伝子組み換え体の利用(山本ら、特開昭64-6219号公報)でTMを容易に得ることが可能となり、その医薬品としての開発が行われるようになった。TMを抗血液凝固剤あるいは血栓溶解剤として広く安定的に供給するためには凍結乾燥を行って製剤化することは必須の操作である。ところが、本発明者らはTM含有溶液を凍結乾燥すると、微量ではあるが一部が変性によって高分子化し、TM分子がいくつか会合した多量体が生成することを明らかにした。蛋白質の凍結乾燥では水分が一部水和層まで脱水され、部分的に環境が極端に非水化されるこ

とによって、蛋白質の構造保持機構が破壊され、変性が起こるものと考えられる。TMは医薬品として開発されているものであるため、変性物を含んでいる場合には、その抗原性を含めた安全性が問題となる。このような実状では、その抗血液凝固作用や血栓溶解作用にもかかわらず、治療薬として安全なTM組成物を提供することは不可能である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】前記のように、変性物を含むTM組成物は人体に投与することは好ましくなく、治療薬として用いる場合は変性物を含まないTM組成物が望ましい。このため、TMの凍結乾燥工程での変性による高分子化を防止し、安全で安定なTM組成物および該組成物を得る方法が要求される。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは前記の問題点を解決するために鋭意研究を行った結果、アミノ酸またはその塩類、あるいは糖類より選択される一種または二種以上を添加することで、凍結乾燥工程でのTMの変性を防止しうることを見出し、良好なTM凍結乾燥組成物が得られ、本発明を完成した。

【0009】本発明は、上記の知見に基づいて完成されたもので、トロンボモジュリン、およびアミノ酸またはその塩類および糖類よりなる群から選ばれた一種または二種以上を含有してなるトロンボモジュリン組成物、およびトロンボモジュリンに、アミノ酸またはその塩類および糖類よりなる群から選ばれた一種または二種以上を添加することを特徴とする凍結乾燥工程でのトロンボモジュリンの変性防止方法である。

【0010】まず本発明に用いられるTM原料は公知の方法で生産される。そのようなものとして、たとえば、前記山本らの方法が挙げられる。すなわち、遺伝子操作法によりTM産生能を有する哺乳動物細胞または微生物の培養物から抽出精製する方法である。しかし、本発明に用いられるTM原料の生産方法はこれに限られるものではなく、トロンピンによるプロテインC活性化を促進する作用を有する適宜糖鎖を有してもよいポリペプチドであればよい。すなわち、TMを産生するような組織、またはこれら組織由来の組織培養液から抽出精製するような原料生産法も採用できる。好ましくは、例えばヒト由来のTM遺伝子を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣細胞を培養し、培養液から高純度に精製されたもので、細胞質ドメインを含まない可溶性TMが挙げられる。一般には抽出精製工程を経ることにより、適宜等張化剤（塩化ナトリウムなど）、緩衝化剤（リン酸ナトリウムなど）といった塩類を含むTM含有溶液として得られる。

【0011】また本発明における凍結乾燥工程でのトロンボモジュリンの変性を防止する添加物としては、アミノ酸またはその塩類および糖類よりなる群から選ばれた

一種または二種以上が用いられる。このアミノ酸またはその塩類としては、例えばアルギニン、グルタミン酸、プロリン、セリン、グリシン、ヒスチジン、アスパラギン、リジン、フェニルアラニンおよびバリンまたはその塩類よりなる群から選ばれたの一種または二種以上が挙げられ、好ましくはアルギニンまたはその酸付加塩、グルタミン酸またはその塩基付加塩、ヒスチジンまたはその酸付加塩、リジンまたはその酸付加塩などのアミノ酸またはその塩類や遊離型としてのプロリン、セリン、グリシン、アスパラギン、フェニルアラニン、バリンなどが挙げられる。

【0012】また、糖類としては、例えば単糖類または二糖類が好適であり、特に好ましくはマンニトール、トレハロース、ラクトースまたはスクロースである。上記の添加物において最も好ましくは、アルギニンまたはその酸付加塩、グルタミン酸またはその塩基付加塩、プロリン、セリンである。上記添加物を使用すれば、本発明は第3物質である等張化剤、緩衝化剤などの塩類の影響を受けるものではないが、これら塩類、特に塩化ナトリウムの濃度が高いことは本発明を用いて凍結乾燥を行う際、ケーキの形成に害を及ぼす。またケーキ形成補助剤あるいはTMの容器への吸着を防止する目的で、適宜アルブミン、ゼラチン等を添加してもよい。

【0013】アルギニン酸付加塩の場合、付加しうる酸としては製剤学的に許容されるものであれば特に制限はなく、たとえば、塩酸、クエン酸、硫酸など、ならびにそれらと機能上同等の物質を挙げることができる。同様に、ヒスチジン酸付加塩の場合、付加しうる酸としては製剤学的に許容されるものであれば特に制限はなく、たとえば、塩酸、クエン酸、硫酸など、ならびにそれらと機能上同等の物質を挙げることができる。

【0014】同様に、グルタミン酸塩基付加塩の場合は、付加しうる塩基としては製剤学的に許容されるものであれば特に制限はなく、たとえば、ナトリウム、カリウムなど、ならびにそれらと機能上同等の物質を挙げることができる。同様に、リジン酸付加塩の場合、付加しうる酸としては製剤学的に許容されるものであれば特に制限はなく、たとえば、塩酸、クエン酸、硫酸など、ならびにそれらと機能上同等の物質を挙げることができる。

【0015】本発明で用いる添加物の添加量は、TM 1mgあたり0.01~1mmolである。添加量が0.01mmol未満では変性防止効果は不十分であり、また、1mmolを越えて添加しても、変性防止効果を増大させるものではなく、経済的に不利である。添加方法は特に限定されないが、たとえば、添加物を直接TM含有溶液に添加する方法、またはあらかじめ添加物を水、注射用蒸留水あるいは適当な緩衝液に溶解して添加する方法などが挙げられる。添加時期は凍結乾燥前であれば分離精製過程であっても、製剤化工程であってもよい。

5

【0016】また、例えば製剤化工程においては、アンブルまたはバイアルに、水、注射用蒸留水あるいは適当な緩衝液1mlあたり0.05~15mg、好適には0.1~5mgのTMおよび上記添加物を含有する溶液を、例えば0.5~10ml充填し、次いで常法により凍結乾燥して注射用製剤として調整できる。このような注射用製剤としては、例えば1日1~3回投与として0.01~100mg含有した凍結乾燥製剤として得ればよい。

【0017】

【実施例】以下、実施例及び比較例により本発明を具体的に説明するが、本発明は何らこれらによって限定されるものではない。

【0018】

【実施例1】注射用蒸留水2mlあたり1mgのTM（チャイニーズハムスター卵巣細胞で培養して得られたヒト由来の光散乱法にて分子量約62000の糖鎖型の可溶性TMである）を含む溶液を調製した。このTM溶液にグルタミン酸ナトリウム0.05mmolを添加した。さらに、該溶液を2mlずつガラスバイアル瓶に分注し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥は-40℃で18時間予備凍結し、-40~+20℃、真空度0.05~0.01mmHgで40時間一次乾燥し、ついで20℃、真空度0.05~0.01mmHgで6時間二次乾燥した。

【0019】次いでこの凍結乾燥品を再溶解後、サイズ排除クロマトグラフィー分析を行い高分子化したTMの割合を求めた。分析には、内径7.5mm、長さ60cmのステンレス管に排除限界分子量50万の親水性シリカゲルを充填したカラムを使用し、0.1M硫酸ナトリウムを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）を溶離液として、波長210nmで検出した。結果は下記表1に示した。

【0020】

6

【実施例2】添加物をプロリンとした以外は実施例1と同様に行った。結果は表1に示した。

【0021】

【実施例3】添加物をセリンとした以外は実施例1と同様に行った。結果は表1に示した。

【0022】

【実施例4】添加物をグリシンとした以外は実施例1と同様に行った。結果は表1に示した。

【0023】

10 【実施例5】添加物をヒスチジーン塩酸塩とした以外は実施例1と同様に行った。結果は表1に示した。

【0024】

【実施例6】添加物をアスパラギンとした以外は実施例1と同様に行った。結果は表1に示した。

【0025】

【実施例7】添加物をリジン塩酸塩とした以外は実施例1と同様に行った。結果は表1に示した。

【0026】

20 【実施例8】添加物をフェニルアラニンとした以外は実施例1と同様に行った。結果は表1に示した。

【0027】

【実施例9】添加物をバリンとした以外は実施例1と同様に行った。結果は表1に示した。

【0028】

【実施例10~15】添加物をアルギニン塩酸塩とし、添加量を0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5mmolとした以外は実施例1と同様に行った。結果は表1、図1に示した。

【0029】

30 【実施例16】添加物をマンニトールとした以外は実施例1と同様に行った。結果は表1に示した。

【0030】

【表1】

| | 添加物種類 | 添加量 (mmol) | 変性物割合 (%) |
|-------|-------------|---------------|--------------|
| 実施例1 | グルタミン酸ナトリウム | 0.05 | 0.10 |
| 実施例2 | プロリン | 0.05 | 0 |
| 実施例3 | セリン | 0.05 | 0.22 |
| 実施例4 | グリシン | 0.05 | 0.48 |
| 実施例5 | ヒスチジナー塩酸塩 | 0.05 | 0.65 |
| 実施例6 | アスパラギン | 0.05 | 0.68 |
| 実施例7 | リジナー塩酸塩 | 0.05 | 0.80 |
| 実施例8 | フェニルアラニン | 0.05 | 1.07 |
| 実施例9 | バリン | 0.05 | 1.10 |
| 実施例10 | アルギニナー塩酸塩 | 0.01 | 0.51 |
| 実施例11 | アルギニナー塩酸塩 | 0.02 | 0 |
| 実施例12 | アルギニナー塩酸塩 | 0.05 | 0 |
| 実施例13 | アルギニナー塩酸塩 | 0.1 | 0 |
| 実施例14 | アルギニナー塩酸塩 | 0.2 | 0 |
| 実施例15 | アルギニナー塩酸塩 | 0.5 | 0 |
| 実施例16 | マンニトール | 0.05 | 0.39 |

【0031】

【実施例17】添加物をトレハロースとした以外は実施例1と同様に行った。

【0032】

【実施例18】添加物をラクトースとした以外は実施例1と同様に行った。

【0033】

【実施例19】添加物をスクロースとした以外は実施例1と同様に行った。

【0034】

【実施例20】添加物として、アルギニナー塩酸塩およびスクロースの二種を併用し、その添加量をそれぞれ 0.05mmolとした以外は実施例1と同様に行った。

【0035】

【実施例21】添加物として、アルギニナー塩酸塩0.05mmolおよび精製ゼラチン10mgとした以外は実施例1と同様に行った。

【0036】

【比較例1】添加物を加えなかったこと以外は実施例1と同様に行った。結果は表2に示した。

【0037】

【比較例2～5】添加物を塩化ナトリウムとし、添加量を0.01、0.02、0.05、0.1mmolとした以外は実施例1と同様に行った。結果は表2に示した。

【0038】

【表2】

| | 添加物種類 | 添加量 (mmol) | 変性物割合 (%) |
|-------|---------|---------------|--------------|
| 比較例 1 | 添加物なし | 0 | 1.17 |
| 比較例 2 | 塩化ナトリウム | 0.01 | 1.35 |
| 比較例 3 | 塩化ナトリウム | 0.02 | 1.46 |
| 比較例 4 | 塩化ナトリウム | 0.05 | 1.93 |
| 比較例 5 | 塩化ナトリウム | 0.1 | 2.07 |

【0039】

【発明の効果】前記実施例および比較例の結果から明らかなように、本発明によれば、TMの凍結乾燥工程での変性による高分子化を防止し、変性物を含まないTM組成物を得ることが可能となる。これによって、凝固線溶

系に広く作用し、優れた血液凝固抑制作用を有するTMを安全な治療薬として供給することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、アルギニン塩酸塩の各種添加量に対するTMの変性物割合の関係を示す図である。

【図1】

